

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI STANOVENÍ MYKOTOXINŮ V JEČMENI A SLADU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ROBERT ČUTA

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI STANOVENÍ MYKOTOXINŮ V JEČMENI A SLADU

ANALYSIS OF MYCOTOXINS IN BARLEY AND MALT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ROBERT ČUTA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. SYLVIE BĚLÁKOVÁ

BRNO 2009

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou mykotoxinů obsažených v obilovinách, zvláště v ječmeni a sladu.

Teoretická část shrnuje poznatky o mykotoxinech a jejich výskytu. Jsou zde rozebírány možnosti stanovení mykotoxinů.

V experimentální části byla optimalizována metoda extrakce deoxynivalenolu na ultrazvuku. Ke stanovení deoxynivalenolu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (HPLC – MS/MS). Tato metoda byla využita ke stanovení obsahu deoxynivalenolu v ječmeni a z něj vyrobeného sladu.

Bakalářská práce byla realizována ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském a. s. v Brně.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the mycotoxines present in cereals, especially in barley and malt.

Theoretical part summarizes the knowledge of mycotoxines and their occurrence. The possibilities of mycotoxines determination are held forth in this thesis.

In the experimental part an ultrasonic extraction method of deoxynivalenol was optimized. For the deoxynivalenol determination was used a method of high-performance liquid chromatography with a mass detector (HPLC – MS/MS). This method was used for deoxynivalenol determination in barley and malt produced from this barley.

The bachelor's thesis was implemented in the Research Institute of Brewing and Malting, Plc. in Brno.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mykotoxiny, trichotheceny, HPLC, HPLC – MS/MS, ječmen, slad

KEYWORDS

Mycotoxins, trichothecenes, HPLC, HPLC – MS/MS, barley, malt

ČUTA, R. *Možnosti stanovení mykotoxinů v ječmeni a sladu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Sylvie Běláková

[1] http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf,
staženo dne 12.01.2009

[2] <http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtobec.htm>,
staženo dne 12.01.2009

[3] <http://www.phyotosanitary.org/old/projekty/2003/vvf-13-03.pdf>,
staženo dne 12.01.2009

[4] <http://www.wikipedia.org>, staženo dne 16.10.2008

[5] <http://www.chpr.szu.cz>, staženo dne 13.3.2009

[6] <http://upload.wikimedia.org>, staženo dne 3.2.2009

[7] <http://www.fermentek.co.il>, staženo dne 3.2.2009

[8] <http://www.aspergillusflavus.org/images/AFB1.gif>, staženo dne 5.2.2009

[9] <http://www.axxora.com/files/formula/630-103.gif>, staženo dne 18.3.2009

[10] <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/aflatox2.html>, staženo dne 3.2.2009

[11] http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/fachinformationen/verbraucherschutz/unerwunschte_stoffe/pic/aflafo4.gif, staženo dne 11.4.2009

[12] http://www.aflatoxin.info/images/afla_2.jpg, staženo dne 3.4.2009

[13] KOSAŘ, K., Procházka, S. a kolektiv autorů: *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sadařský, a. s., 2000. 31,76 s. ISBN 80-902658-6-3.

[14] BABÁK L.; *Technologie výroby piva*. Přednášky BIOTECHNOLOGIE I, VUT Brno 2009

[15] Ing. Zuzana Radová-Sypecká ve spolupráci s Prof. Ing. Janou Hajšlovou, CSc.: *Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření*. VVF-04-02

[16] MALÍŘ F., OSTRÝ V. a kol. autorů: *Vláknité mikromycety (Plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*, Brno 2003.

[17] http://newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=70&Itemid=20

[18] KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplněné vydání Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003 ISBN 80-86369-07-2

[19] http://holcapek.upce.cz/publications_CZ.htm, staženo dne 18.10.2008

[20] Finnigan Ion Max API Source hardware manual, Thermo Electron corp., San Jose, California, 2003

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce paní Ing. Sylvii Bělákové za poskytnutí odborných rad při řešení dané práce. Dále bych chtěl poděkovat paní RNDr. Renatě Mikulíkové z VÚPS za umožnění provedení bakalářské práce. Také bych rád poděkoval Bc. Michaelae Fričové za pomoc při stylizaci textu.

OBSAH

Abstrakt	3
Abstract	3
Klíčová slova	3
Keywords.....	3
PROHLÁŠENÍ	5
PODĚKOVÁNÍ	6
OBSAH	7
1 ÚVOD.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Toxinogenní plísně.....	10
2.1.1 Rod Aspergillus.....	10
2.1.2 Rod Penicillium.....	10
2.1.3 Rod Fusarium.....	10
2.2 Rozdělení mykotoxinů.....	10
2.3 Trichotheceny	12
2.3.1 Deoxynivalenol	15
2.3.2 Nivalenol	15
2.3.3 T - 2 toxin	16
2.3.4 HT – 2 toxin.....	17
2.4 Aflatoxiny	17
2.4.1 Aflatoxin B ₁	18
2.4.2 Aflatoxin B ₂	18
2.4.3 Aflatoxin G ₁	19
2.4.4 Aflatoxin G ₂	20
2.4.5 Aflatoxin M ₁	20
2.5 Ochratoxiny	21
2.5.1 Ochratoxin A.....	21
2.6 Patulin.....	22
2.7 Fumonisin	23
2.7.1 Fumonisin B ₁	23
2.7.2 Fumonisin B ₂	24
2.8 Zearalenon	24
2.9 Pivovarské suroviny	25
2.9.1 Ječmen	25
2.9.2 Chmel	26
2.9.3 Voda	27
2.10 Výroba sladu.....	27
2.10.1 Skladování	27
2.10.2 Máčení	27
2.10.3 Klíčení	28
2.10.4 Enzymy odbourávající polysacharidy	28

2.10.5	Stadia klíčení.....	28
2.10.6	Hvozďení.....	29
2.10.7	Výroba piva.....	29
2.10.8	Výroba mladiny.....	29
2.10.9	Šrotování.....	29
2.10.10	Vystírání.....	29
2.10.11	Rmutování.....	30
2.10.12	Scezování	30
2.10.13	Chmelovar	30
2.10.14	Kvašení mladiny	31
2.10.15	Dokvašování a zrání mladého piva.....	31
2.11	Výskyt mykotoxinů	31
2.11.1	V ječmeni.....	31
2.11.2	Ve sladu	32
2.11.3	V pivu	32
2.11.4	Legislativa.....	32
2.12	Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v ječmeni a sladu	33
2.12.1	Odběr a zpracování vzorku	33
2.12.2	Extrakce	33
2.12.3	Čištění.....	33
	Imunoafinitní chromatografie (IAC)	33
	Extrakce na pevnou fázi (SPE)	34
2.12.4	Analytické metody	34
2.13	Hmotnostní spektrometr finnigan LCQ Advantage MAX.....	36
3	Experimentální část	40
3.1	Stanovení deoxynivalenolu (DON) metodou HPLC/MS/MS	40
3.1.1	Princip metody	40
3.1.2	Přístroje a zařízení.....	40
3.1.3	Chemikálie, roztoky, materiály.....	40
3.1.4	Příprava roztoků.....	41
3.1.5	Pracovní postup.....	41
4	Výsledky a diskuse.....	42
4.1	Kalibrace	42
4.2	Podmínky analýzy:	42
4.3	Stanovení deoxynivalenolu ve vzorku ječmene a sladu metodou LC-MS/MS	43
5	Závěr.....	45
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	46
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	48
8	Seznam příloh	49
9	Přílohy	50

1 ÚVOD

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých hub. Existuje okolo 200 producentů těchto toxinů jako například rody *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto houby jsou schopné přežívat v nejrůznějších podmínkách i klimatech na zemědělských surovinách (obilí, koření, ovoce, káva, ořechy atd.) a to jak při jejich pěstování tak i skladování. Jejich výskyt v potravinách, nápojích a krmivech je považován za vážné riziko pro zdraví člověka a zvířat. Mykotoxiny jsou nefrotoxické, neurotoxické, karcinogenní, imunosupresivní. Existují stovky druhů mykotoxinů vyznačujících se velkou strukturální diverzitou. Většina z nich je termálně i chemicky stabilní. Nelze je, nebo jen částečně, odstranit při zpracování potravin. V dnešní době je kladen největší důraz na obsah aflatoxinů, trichotecenů, ochratoxinu A, zearalonu, fumonisinů a patulinu v potravinářských výrobcích a krmivech. Faktory, ovlivňující přítomnost mykotoxinů v krmivech a potravinách, v sobě zahrnují podmínky při skladování: teplotu, vlhkost, použití fungicidů, okolní podmínky. Stále však není zcela objasněn mechanismus vzniku mykotoxinů ani ideální podmínky jejich vzniku.

Jednotlivé průzkumy dokázaly, že problém s kontaminací mykotoxiny je celosvětový. Odhaduje se, že až 25% celosvětové a 20% evropské sklizně může být kontaminováno. Měření obsahu mykotoxinů v obilninách a jiných zemědělských produktech se provádí po celém světě a to zejména v surovinách produkovaných zeměmi třetího světa. Jsou ustanoveny maximální tolerovatelné množství obsahu jednotlivých mykotoxinů v potravinách a krmivech. Limity se pohybují v $\mu\text{g.kg}^{-1}$ až v ng.kg^{-1} záleží na typu potravin či krmiva.

Pod záštitou regulačních orgánů jako je Evropská komise a Food and Drug administration (FDA), byly uskutečněny rozsáhlé výzkumy na vytvoření rychlé a spolehlivé metody na stanovení velkého počtu vzorků. Tyto metody jsou používány pro monitorování hladin ppb a ppt v široké škále potravinářských oblastí. Zvláště pro vysoce toxické a karcinogenní aflatoxiny, zde jsou komerčně dostupné vysoce citlivé imunochemické metody. Podobné sady testů jsou dostupné téměř pro všechny významné mykotoxiny, zvláště pro OTA a ZON. Jejich pomocí lze rychle a jednoduše prověřovat vzorky potravinářských produktů a krmiv. K určení přesného množství, ve vzorku pozitivního na obsah mykotoxinů, je využíváno chromatografických metod spojených s různými detekčními principy. V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech jednotlivých mykotoxinů se pro stanovení využívají různé analytické metody.

Analytické metody používané ke stanovení mykotoxinů se neustále vyvíjejí, v současnosti je jednou z nejpoužívanějších metod LC - API/MS (kapalinový chromatograf s atmosferickým ionisátorem vybavený hmotnostním detektorem). Výhodou je možnost stanovení vysoce polárních, degradovaných nebo metabolicky transformovaných vzorků. Metoda umožňuje potvrzení obsahu, objasnění struktury a kvantitativní stanovení stopových množství mykotoxinů ve vzorcích. GC/MS a LC/MS jsou všeobecně schválené a velice spolehlivé analytické přístroje. [1]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Toxinogenní plísně

2.1.1 Rod *Aspergillus*

Jde o fylogeneticky starý rod. Vřeckaté houby, vytvářejí plodničky měřící okolo jednoho milimetru. Nepohlavní rozmnožovací orgány jsou tvořeny vláčenkem na jehož konci je paprskovitě rozmístěna řada válcovitých buněk, zde dozrávají a odštěpují se nepohlavní spory. Vlákénko se nazývá konidiofor, válcovité buňky fialidy a spory konidie.

2.1.2 Rod *Penicillium*

Tento rod je velmi příbuzný předchozímu, existuje dokonce i skupina druhů na jejich pomezí. Považuje se za fylogeneticky mladší, jejich rozmnožování je však velice podobné. Nepohlavní rozmnožovací orgány jsou rovněž tvořeny konidioforem, fialidami a konidiemi.

2.1.3 Rod *Fusarium*

Na rozdíl od předchozích rodů, v nichž převažují saprofytické druhy, jsou fusaria především parazité. Jsou však schopna i saprofytického růstu, proto je lze pěstovat na umělých půdách. Jsou ale zpravidla náročnější a obtížněji vytvářejí makrokonidie. V kulturách velice často vytvářejí bílé či narůžovělé mycelium, rostoucí ve snopcích od půdy k víčku misky. Některé kmeny zabarvují substrát do růžova až červena. Konidiofory fusarií jsou malé a nenápadné. Konidie jsou dvojí. Mikrokonidie jsou tvořeny zpravidla jednou buňkou. Makrokonidie mají srpovitý tvar, skládají se z většího počtu buněk a nesou důležité druhové znaky. [1]

2.2 Rozdělení mykotoxinů

Mykotoxiny lze rozdělit podle velkého množství kritérií (Tab. 1–3). Žádné z dosud používaných však nelze považovat za univerzálně použitelné. Nejjednodušší je rozdělení podle chemické struktury. Jeho výhodou je poměrně snadné a jednoznačné zařazení jakékoli látky o známé chemické struktuře. [2]

Tab. 1: Dělení mykotoxinů podle chemické struktury [2]

Furanofurany	aflatoxiny, sterigmatocystin, versicolorin
Substituované pyreny a hydroxypyreny	kyselina koji, sekalonové kyseliny
Substituované chinony	luteoskyrin, rubratoxin, xanthomegnin, viridicatumtoxin
Nenasycené laktony	patulin, kyselina penicillová, ochratoxiny
Griseofulviny	griseofulvin
Epoxytrichothecen	T-2 toxin, deoxynivaleno, nivalenol
Polycyklické substituované indolové deriváty	kyselina cyklopiazonová, paspaliny, penitrems
Cyklické dipeptidy	gliotoxin, sporidesminy, roquefortin, fumitremorgen, verruculogeny, brevianamidy
Mykotoxiny jiné struktury	zearalenon, curvularin, citrinin, PR-toxin, canthecellin, moniliformin, kyselina betanitropropionová

Tab. 2: Dělení mykotoxinů podle způsobu biosyntézy [2]

Biosyntéza moniliforminu	moniliformin (z kyseliny octové)
Biosyntéza z polyketidů	patulin, ochratoxin, emodin, kyselina sekalonová, aflatoxiny
Biosyntéza z isoprenoidů	trichothecen, roquefortin
Biosyntéza z aminokyselin	kyselina cyklopiazonová, cyklické dipeptidy

Tab. 3: Dělení mykotoxinů podle toxicity – kvantitativní [2]

Silně toxické	aflatoxiny, patulin, luteoskyrin, sporidesminy, ochratoxin A, zearalenon (F-2 toxin), T-2 toxin, DAS (diacetoxyscirpenol),
Středně toxické	citrinin, kyselina penicillová, sterigmatocystin, kyselina cyklopiazonová
Slabě toxické	griseofulvin, kyselina koji, trihothecin, kyselina mykofenolová, chaetomin

Tab. 4: Dělení mykotoxinů podle toxicity – kvalitativní [2]

Hepatotoxiny	aflatoxiny, sporidesminy, luteoskyrin, sterigmatocystin
Nefrotoxiny	ochratoxin A, citrinin, T-2 toxin
Neurotoxiny a myotoxiny	tremorgeny, citreoviridin
Dermotoxiny	verrucariny, psoraleny, sporidesminy, trichotheceny
Toxiny dýchacího traktu	patulin
Genitotoxiny	zearalenon
Imunotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, trichotheceny

Tab. 5: Rozdělení mykotoxinů podle účinku na buňku [2]

Inhibitory tvorby energie	citreoviridin, luteoskyrin, xanthomegnin, kyselina sekalonová D, moniliformin
Inhibitory proteosyntézy	trichotheceny, ochratoxin A
Modifikátory cytoskeletu	griseofulvin, cytochalasiny, cyclochlorotin
Estrogenní mykotoxiny	zearalenon
Tremorgeny	penitremy (A B C), fumitremorginy (A a B), verruculogeny
Karcinogenní mykotoxiny	aflatoxin B ₁

2.3 Trichotheceny

Struktura a názvosloví

Trichotheceny se odvozují od základního skeletu prvního známého členu této skupiny – trichothekanu. Souhrnně se proto označují jako 12, 13-epoxy-9-trichotheceny.

Trichotheceny lze obecně rozdělit do dvou skupin:

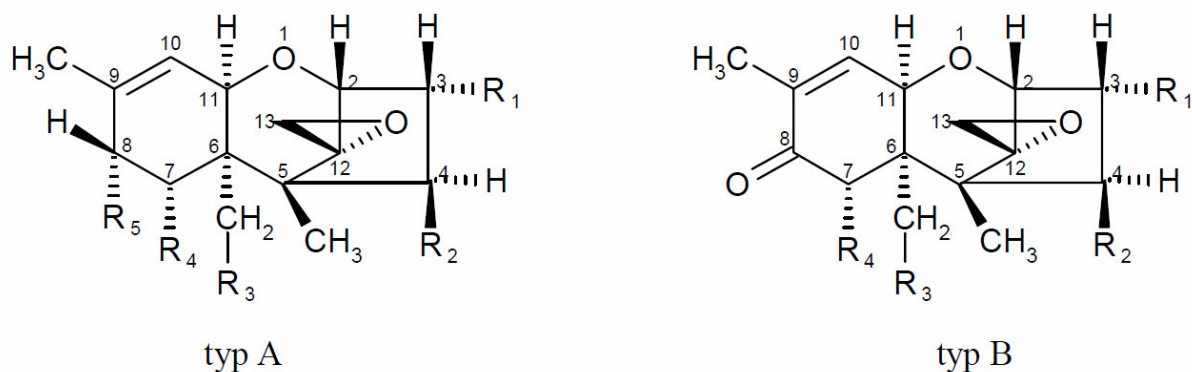
- alkoholderiváty trichothecenů a jejich jednoduché estery
- složitější makrocyclické diestery a triestery

Jiným, častějším způsobem klasifikace je dělení podle přítomných funkčních skupin:

- typ A obsahující na uhlíku C-8 jinou funkční skupinu než ketonickou
- typ B, kde je na uhlíku C-8 karbonylová skupina

- typ C, který obsahuje mimo epoxyskupiny v poloze C-12, C-13 další epoxyskupinu v poloze C-7 a C-8 nebo C-8 a C-9
- typ D s makrocyclickým kruhovým systémem mezi C-4 a C-15 spojený esterovými vazbami

V současné době je známo více než 170 trichothecenů. Houby rodu *Fusarium* produkují pouze toxiny skupiny A a B (Obr. 1).



Obr. 1: Trichotheceny - typ A, typ B

Tab. 6: Funkční skupiny nejvýznamnějších trichothecenů [3]

Typ	Název mykotoxinu	Zkratka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	Monoacetoxyscirpenol	MAS	OH	OH	OCOCH ₃	H	H
	Diacetoxyscirpenol	DAS	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H
	T-2 tetraol	T-2 tetr.	OH	OH	OH	H	OH
	T-2 toxin	T-2 tox.	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	HT-2 toxin	HT-2 tox.	OH	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	T-2 triol	T-2 triol	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	Neosolaniol	NEO	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃		OH
B	Nivalenol	NIV	OH	OH	OH	OH	-
	Fusarenon-X	FUS-X	OH	OCOCH ₃	OH	OH	-
	Deoxynivalenol	DON	OH	H	OH	OH	-
	3-acetyl-deoxynivalenol	3-ADON	OCOCH ₃	H	OH	OH	-
	15-acetyl-deoxynivalenol	15-ADON	OH	H	OCOCH ₃	OH	-

Fyzikální a chemické vlastnosti

Trichotheceny jsou bezbarvé, opticky aktivní, většinou krystalické pevné látky. Jsou termostabilní do teploty 120 °C, středně stabilní při teplotě 180 °C a rozkládají se během 30-40 minutového působení teplot 200-210 °C.

Trichotheceny typu A jsou rozpustné v mírně polárních rozpouštědlech jako jsou chloroform, diethylether a ethylacetát, zatímco více polární trichotheceny typu B vyžadují polárnější rozpouštědla (např. směsi methanol:voda, acetonitril:voda).

Trichotheceny patří mezi stabilní látky. Samotná epoxidová skupina C-12, 13 je extrémně stabilní vůči nukleofilní substituci. Při dlouhodobém varu v silně kyselém prostředí dochází k intramolekulárnímu přesmyku trichothecenového skeletu na apotrichothecenový kruh.

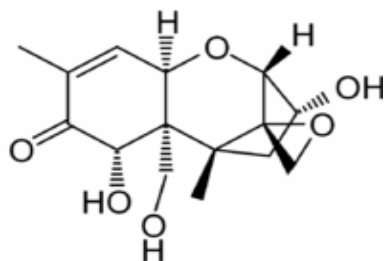
Tab. 7: Fyzikální vlastnosti Trychothecenů [3]

Trichothecen	Sumární vzorec	Molek. hmot. (g.mol ⁻¹)	Bod tání (°C)	Optická otáč. [α] ²⁰ _D
Monoacetoxyscirpenol	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	324	172-173	-
Diacetoxyscirpenol	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366	161-162	-27
T-2 tetraol	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	298	-	-
T-2 toxin	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466	151-152	+15
HT-2 toxin	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424	-	-
Neosolaniol	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	382	171-172	-
Nivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	222-223	+21,54
Fusarenon-X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354	91-92	+53
Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	151-153	+6,35
3-acetyl-deoxynivalenol	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	135-136	-

Toxikologické údaje

- deoxynivalenol (DON) vykazuje nejnižší akutní toxicitu mezi významnými trichothecenami v pořadí:
- T-2 toxin ⇒ diacetoxyscirpenol (DAS) ⇒ nivalenolem (NIV) ⇒ deoxynivalenol (DON) ,
- akutní intoxikace je charakterizována iritací kůže, nechutenstvím, zvracením průjmy, hemoragiemi, nervovými poruchami
- Z hlediska akutní toxicity je T-2 toxin nejúčinnější ze skupiny trichothecenových mykotoxinů.
- T-2 toxin po dlouhodobém podávání nevykázal u pokusných zvířat tumorogenní účinek, ten se nepředpokládá ani u lidí. [3]

2.3.1 Deoxynivalenol



Obr. 2: Strukturní vzorec Deoxynivalenolu [4]

Sumární vzorec: $C_{15}H_{20}O_6$

Molekulová hmotnost: $296,00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Krystalická látka bez zápachu, patří mezi polární trichotheceny.

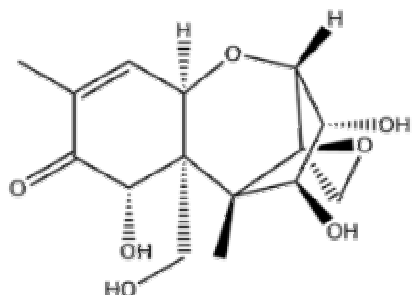
Bod tání: $151 - 153 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rozpustnost: Je dobře rozpustný ve vodě, acetonitrilu, chloroformu, směsi octan ethylnatý: acetonitril (4:1), ve směsi chloroform : methanol (9:1) a nerozpustný v hexanu a petroléteru.

Producenti: *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*

Zdroj: Zejména obiloviny a výrobky z obilovin [5]

2.3.2 Nivalenol



Obr. 3: Strukturní vzorec Nivalenolu [6]

Sumární vzorec: $C_{15}H_{20}O_7$

Molekulová hmotnost: 312,30 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Krystalická látka bez zápachu, patří mezi polární trichotheceny

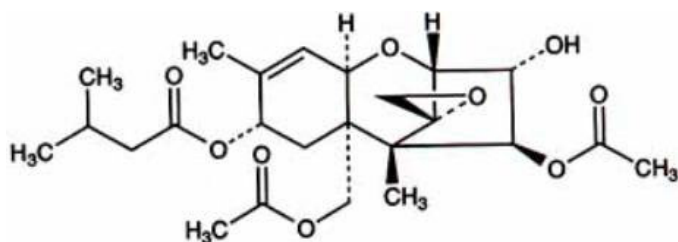
Bod tání: 138 - 140 °C

Rozpustnost: Je rozpustný v polárních rozpouštědlech, methanolu, acetonitrilu, octanu ethylnatém. Méně rozpustný ve vodě a chloroformu.

Producenti: *Fusarium cerealis*, *Fusarium poae*

Zdroj: Zejména obiloviny a výrobky z obilovin [5]

2.3.3 T - 2 toxin



Obr. 4: Strukturní vzorec T – 2 toxinu [7]

Sumární vzorec: $C_{24}H_{34}O_9$

Molekulová hmotnost: 466,00 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílé krystalické jehličky, méně polární trichothecen

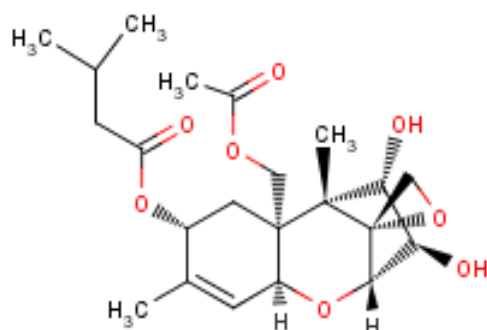
Bod tání: 151 - 152°C

Rozpustnost: Je dobře rozpustný v acetonitrilu, chloroformu, směsi octan ethylnatý: acetonitril (4:1), ve směsi chloroform : methanol (9:1) a nerozpustný v hexanu a petroléteru.

Producenti: *Fusarium acuminatum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*

Zdroj: Zejména obiloviny a výrobky z obilovin

2.3.4 HT – 2 toxin



Obr. 5: Strukturní vzorec HT – 2 toxinu [7]

Sumární vzorec: $C_{22}H_{32}O_8$

Molekulová hmotnost: $424,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílé krystalické jehličky, méně polární trichothecen

Bod tání: $151 - 152^\circ\text{C}$

Rozpustnost: Je dobře rozpustný v dichloromethanu, ethanolu. Méně rozpustný v petrolétheru a velmi málo ve vodě.

Producenti: *Fusarium acuminatum*, *Fusarium poae*

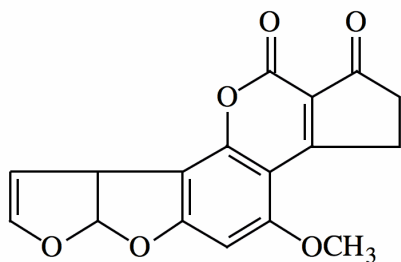
Zdroj: Zejména obiloviny a výrobky z obilovin

2.4 Aflatoxiny

Struktura a vlastnosti

Jsou to polycyklické, nesaturované, vysoce substituované kumariny. Vyskytuje se mnoho typů aflatoxinů ty základní jsou B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M. Aflatoxiny mají spojenou dihydrofuranovou konfiguraci pro ně charakteristickou. Kumarinové jádro s bifuranovým systémem je spojeno buď s pentanonem nebo se šestičlenným laktone. Aflatoxiny jsou jak toxické tak i karcinogenní.

2.4.1 Aflatoxin B₁



Obr. 6: Strukturní vzorec Aflatoxinu B₁ [8]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₆

Molekulová hmotnost: 312,00 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Světle žluté krystaly, emituje v UV světle modrou fluorescenci

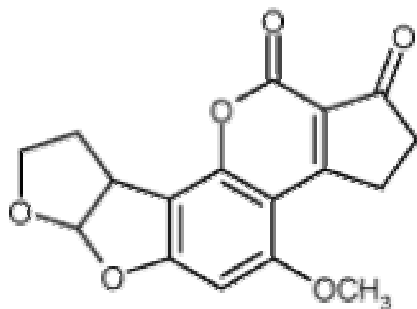
Bod tání: 268 – 269 °C

Rozpustnost: Nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech

Producenti: *Aspergillus argentinicus*, *Aspergillus flavus*

Zdroj: Zejména jádra ořechů, sušené ovoce, obiloviny.

2.4.2 Aflatoxin B₂



Obr. 7: Strukturní vzorec Aflatoxinu B₂ [9]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}O_6$

Molekulová hmotnost: $314,30 \text{ g.mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Světle žluté krystaly, emituje v UV světle modrou fluorescenci

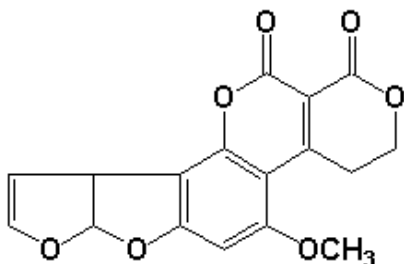
Bod tání: $286 - 289^\circ\text{C}$

Rozpustnost: Je dobře rozpustný v methanolu, acetonitrilu, směsi toluen : acetonitril (9:1) a ve směsi benzen : acetonitril (98:2)

Producenti: *Aspergillus argentinicus*, *Aspergillus flavus*

Zdroj: Zejména jádra ořechů, sušené ovoce, obiloviny.

2.4.3 Aflatoxin G_1



Obr. 8: Strukturní vzorec Aflatoxinu G_1 [10]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{12}O_7$

Molekulová hmotnost: $328,00 \text{ g.mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílý až světle žlutý prášek, emituje v UV světle modrozelenou fluorescenci

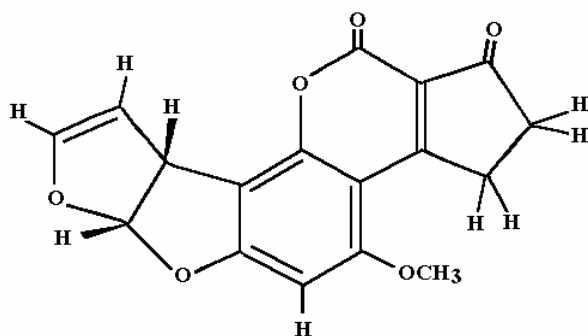
Bod tání: $244 - 246^\circ\text{C}$

Rozpustnost: Je nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech

Producenti: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus*

Zdroj: Zejména jádra ořechů, sušené ovoce, obiloviny.

2.4.4 Aflatoxin G₂



Obr. 9: Strukturní vzorec Aflatoxinu G₂ [11]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₇

Molekulová hmotnost: 330,30 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílý prášek až světle žlutý prášek, emituje v UV světle modrozelenou fluorescenci

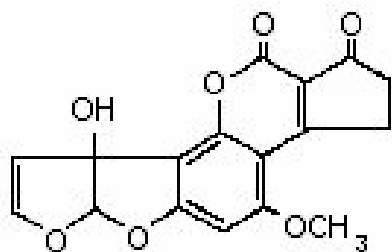
Bod tání: 237 – 240 °C

Rozpustnost: Nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonitrilu a methanolu

Producenti: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus*

Zdroj: Zejména jádra ořechů, sušené ovoce, obiloviny.

2.4.5 Aflatoxin M₁



Obr. 10: Strukturní vzorec Aflatoxinu M₁ [12]

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇

Molekulová hmotnost: 328,00 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Emituje v UV světle modro-fialovou fluorescencí

Bod tání: 299 °C

Rozpustnost: Nerozpustný v hexanu, málo rozpustný v benzenu, rozpustný v methanolu, ethanolu, acetonitrilu, chloroformu, ve směsi methanol : ether (1:1)

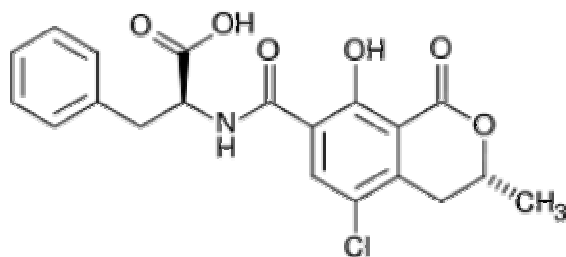
Producenti: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamarii*

Zdroj: Zejména mléčné výrobky, jádra ořechů.

2.5 Ochratoxiny

Lze je charakterizovat jako deriváty 7 – izokumarinu vázané na L-β-fenylalanin. Nejvýznamnějším zástupcem je OTA A, existují však i ochratoxin B, C, D a ochratoxin α.

2.5.1 Ochratoxin A



Obr. 11: Strukturní vzorec Ochratoxinu A [6]

Sumární vzorec: C₂₀H₁₈O₆ClN

Molekulová hmotnost: 403,00 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílá krystalická látka bez zápachu

Bod tání: 168 - 173 °C

Rozpustnost: Rozpustný v organických rozpouštědlech (chloroformu, ethanolu a methanolu)

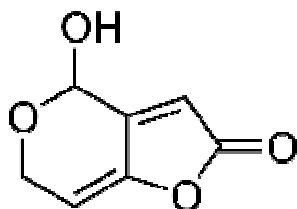
Producenti: *Aspergillus elegans*, *Penicillium commune*

Zdroj: Zejména obiloviny, výrobky z obilovin, pivo káva a sušené ovoce.

2.6 Patulin

Struktura

Jde o nenasycený lakton, patří mezi polyketidové sekundární metabolity.



Obr. 12: Strukturní vzorec Patulinu [6]

Sumární vzorec: $C_7H_6O_4$

Molekulová hmotnost: $154,00 \text{ g.mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bezbarvá krystalická látka bez zápachu

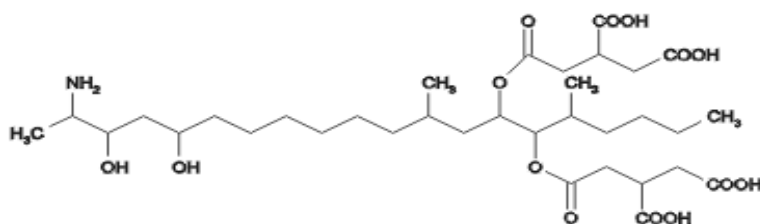
Bod tání: $110 - 111 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rozpustnost: Rozpustný ve vodě, v alkoholech, acetonu, benzenu, chloroformu, ethylacetátu, nerozpustný v petroléteru

Producenti: *Aspergillus clavatus*, *Penicillium expansum*

Zdroj: Zejména jablka a výrobky z nich, ovocné nápoje a kompoty.

2.7.2 Fumonisin B₂



Obr. 14: Strukturní vzorec Fumonisinu B₂ [7]

Sumární vzorec: C₃₄H₅₉NO₁₄

Molekulová hmotnost: 705,80 g.mol⁻¹

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Amorfní pevná látka

Bod tání: 103 - 105 °C

Rozpustnost: Rozpustný ve vodě, více rozpustný ve směsi acetonitril – voda, dobře rozpustný v methanolu, nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech

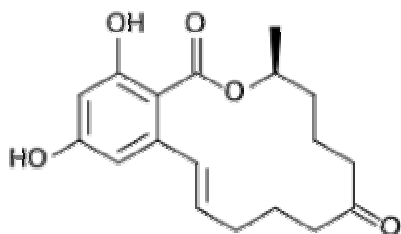
Producenti: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*

Zdroj: Kukuřice, krmiva na bázi kukuřice

2.8 Zearalenon

Struktura

Je to lakton kyseliny β-resorcylové, existuje asi 13 derivátů zearalonu (např. zearanol a taleranol).



Obr. 15: Strukturní vzorec Zearalenonu [6]

Sumární vzorec: $C_{18}H_{22}O_5$

Molekulová hmotnost: $318,00 \text{ g.mol}^{-1}$

Fyzikální vlastnosti:

Popis: Bílá krystalická látka bez zápachu

Bod tání: $164 - 165 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rozpustnost: Rozpustný v organických rozpouštědlech (ether, ethanol, methanol), v alkalických vodných roztocích, je nerozpustný ve vodě

Producenti: *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*

Zdroj: Zejména obiloviny a výrobky z nich

2.9 Pivovarské suroviny

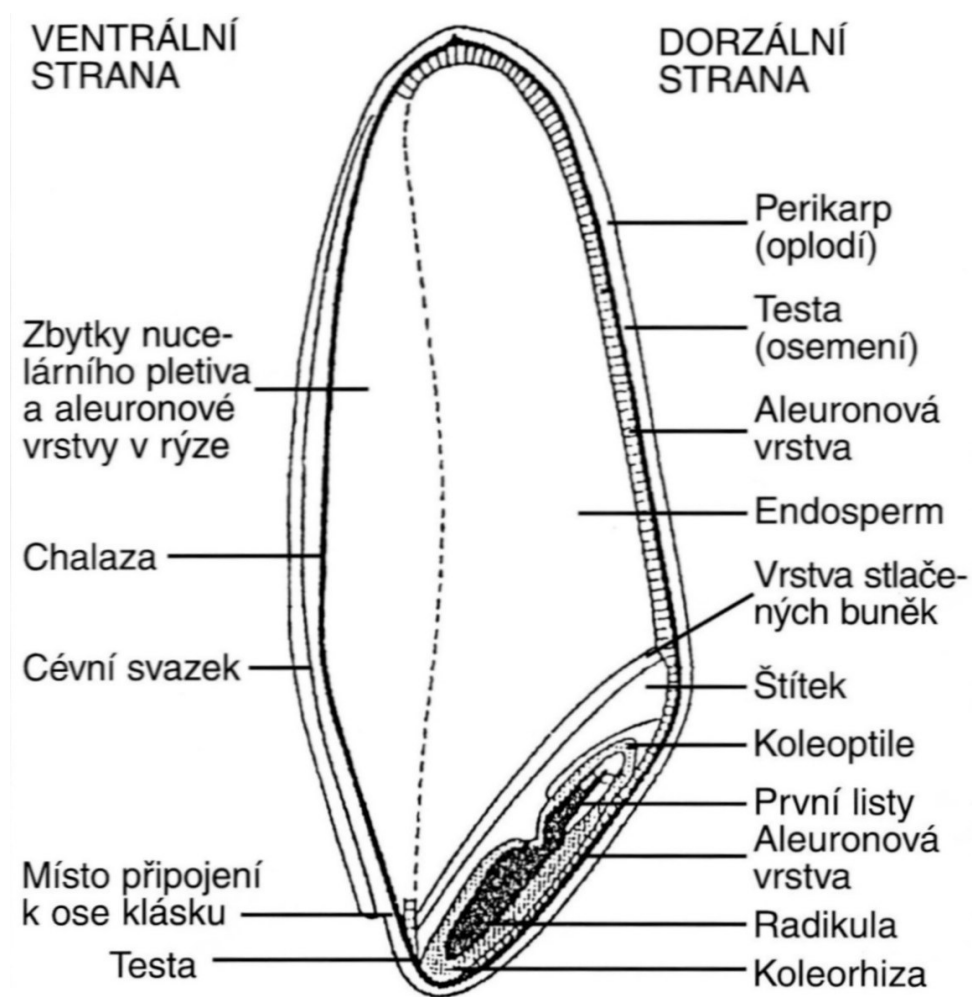
2.9.1 Ječmen

Pro pivovarský průmysl je ječmen nejdůležitější surovinou. Vyrábí se z něj zejména slad, ale i škrob, ethanol, používá se i jako krmivo. Díky obsahu zdravotně prospěšných látek se v poslední době hojně využívá v potravinářství na přípravu těstovin, různých druhů pečiva a pochutin. V České republice se používá zejména ve sladovnictví a to výhradně jarní ječmen *Hordeum distichum* var. *nutans* pěstuje se v Polabí a na Hané.

Obilka ječmene

Obilka ječmene je podlouhlá, vejčitá, na obou koncích zašpičatělá (Obr. 16). Skládá se z obalových vrstev, zárodku a endospermu. Vnější vrstvy jsou složeny z nerozpustných polysacharidů typu celulózy, které chrání obilku před vnějšími vlivy.

Máčením ječmene se zahájí enzymatické reakce významné při výrobě sladu. Dochází ke klíčení zrna. Endosperm obsahuje asi 75 % škrobu, který se využívá jako zásobní látka pro klíčící rostlinu.



Obr. 16: Podélný řez zralou obilkou [13]

2.9.2 Chmel

Hlávky samičích květů (chmelové šištice) nebo extrakt z nich se používají v pivovarnictví při výrobě piva, obsahují totiž hořčiny (lupulin), které mu dodávají chuť a aroma. Jelikož květy ztrácejí po opylení na kvalitě, je třeba dbát na to, aby se ve chmelnici nevyskytovaly samčí rostliny. První historická zmínka o užití chmele pro dochucení piva pochází z listiny franského krále Pipina III. Krátkého z r. 768.

Český chmel (pěstovaný na Žatecko, v Ústěcku a na Hané patří k nejkvalitnějším na světě a občas bývá označován za zelené zlato.

Jedná se rostlinu vytrvalou, na jednom místě vydrží 20 - 25 let.

Menší množství se využívá i ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství a při výrobě kosmetických přípravků.



Obr. 17: Chmel [4]

2.9.3 Voda

Je to neméně důležitá surovina potřebná k výrobě piva. Její kvalita musí odpovídat nejprísnějším hygienickým nárokům.

2.10 Výroba sladu

2.10.1 Skladování

Při skladování ječmene dochází k jeho zrání. Dorminy nacházející se v nedostatečně uzrálém ječmeni inhibují klíčení. Toto stádium se nazývá dormancie.

2.10.2 Máčení

Cílem máčení je zvýšit řízeným způsobem obsah vody v zrně z 15% na 48% nezbytných pro zahájení enzymatických reakcí způsobujících klíčení zrna. Při únosné spotřebě vody je nutné odstranit splavky a lehké nečistoty, umýt zrna a ze zrna vyloužit nežádoucí látky. Podmínkou pro správný průběh klíčení je dostatek vody a vzduchu v namáčeném ječmeni. Máčení ječmene probíhá v kónických náduvnících z legované ocele.

Teplota vody určuje rychlost, kterou zrno vodu přijme. Čím je voda teplejší, tím je rychlost vyšší. Je nutné zrna provětrávat, při máčení dochází k vyšší spotřebě kyslíku.

2.10.3 Klíčení

Cílem sladařského klíčení je aktivace a syntéza enzymů, docílení požadovaného rozluštění zrna při minimálních nákladech a únosných sladovacích ztrátách. Reservní látky, obsažené v zrně jsou při skladování a před zahájením sladovacího procesu ve stabilní, vysokomolekulární formě. Činností vlastních enzymů zrna, aktivovaných pomocí vody dojde k jejich odbourávání (rozluštění) na rozpustné nízkomolekulární produkty. Probíhá na humnech při 14 °C, 5 – 7 dní.

2.10.4 Enzymy odbourávající polysacharidy

Amylázy jsou nepochybně nejdůležitější enzymy sladu. S pomocí amyláz mohou být později odbourány škroby při rmutování.

α - amyláza - není v ječmeni přítomna. Největší množství α - amylázy se tvoří od 2. do 4. dne klíčení. Pro výrobu velmi enzymaticky bohatých sladů, např. pro zpracování velkých množství škrobu např. v lihovarech, se proto nechává slad velmi dlouho klíčit, přičemž obsah α -amylázy se nadále zvyšuje.

β - amyláza - je přítomna již v malém množství v ječném zrně. Po přechodné malé ztrátě v prvním dni klíčení se její množství od 2 a 3. dne dále zvyšuje .

Tvorba β - amylázy je bezprostředně spojena s dýcháním v prvním dni klíčení. Proto je dostatečné provětrávání již v první fázi klíčení důležité pro tvorbu β - amylázy.

2.10.5 Stadia klíčení

Při klíčení rozlišujeme následující:

- a) mokrá hromada - ječmen vymočený na humna nebo do klíčidel
- b) suchá, oschlá hromada - stadium do 24 h po vymočení, objevuje se první hlavní zárodečný kořínek, hromada vyžaduje přívod vzduchu, ječmen špicuje.
- c) pukavka - hromada vyžaduje dostatek vzduchu, objevují se další kořínky, a pokračuje jejich růst, hromada intenzivně dýchá a má výraznou vůni okurek, postupně přechází do stadia vidličkování a mladíku - mladá hromada.
- d) mladík - nejdůležitější fáze klíčení, zrno intenzivně dýchá, intenzivně probíhají enzymatické přeměny, je-li v hromadě nedostatek oxidu uhličitého nadměrně se zvyšují ztráty dýcháním zrna a růstem kořínků.
- e) vyrovnaná hromada - délka kořínků a střílky se vyrovnává, dýchání se zpomaluje, hromada stárne.

f) stará hromada - intenzita dýchání klíčících zrn nadále klesá a je patrné postupné zavadání kořínků. Hromada se cíleně kypří tak, aby v ní zůstala určitá koncentrace oxidu uhličitého, který tlumí intenzitu dýchání a tím růst vegetativních orgánů. V tomto stadiu už nesmí být zelený slad dokrápěn.

Závěr klíčení má výrazný vliv na tzv. prodýchání extraktu a na sladovací ztráty. Hromada postupně čím dál více zavadá a fáze klíčení je ukončena nastíráním zeleného sladu na hvozd.

2.10.6 Hvozdění

Cílem hvozdění je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu. Zastavit životní projevy a luštící pochody v zrně a během hvozdění vytvořit aromatické a barevné látky, charakteristické pro druhy sladu za minimálních nákladů a ztrát. Během hvozdění se tvoří barevné a aromatické látky, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy sladů a piva.

Fáze hvozdění:

- 1) **růstová:** 20-40 °C, vlhkost nad 20 %
- 2) **enzymová:** 40-60 °C, vlhkost pod 20 %
- 3) **chemická:** 60-80 °C pro světlé slady a 60-105 °C pro tmavé slady, vlhkost pod 10 %

Následuje odkličování kdy se z vyklíčených zrn odstraňují kořínky a klíčky tzv. sladový květ. Ten se používá jako krmivo. Hotový slad se nechává odležet v chlazených silech po dobu 6 týdnů.

2.10.7 Výroba piva

2.10.8 Výroba mladiny

Cílem je ze sladu, chmele a vody za co možná nejmenších nákladů vyrobit kvalitní mladé pivo, které následně dozrává v ležáckých tancích. Výroba mladiny je rozdělena do více fází.

2.10.9 Šrotování

Probíhá ve šrotovačce, kdy je celistvý obsah zrna vymáčkut tak, aby se nepoškodil obal. Drcení probíhá mezi dvěma válci.

2.10.10 Vystírání

Jde o dokonalé promíchání s vodou. Odměřené množství šrotu tzv. sypání je vystíráno do vystírací kádě. Přiváděná voda má teplotu 35 – 38 °C. Obsah kádě je neustále promýcháván.

2.10.11 Rmutování

Cílem je rozštěpit vysokomolekulární látky postupným zahříváním na technologicky významné teploty.

1.fáze

35 až 38 °C - **kyselinotvorná teplota**

Kyselinotvorné enzymy štěpí organické sloučeniny za postupného uvolňování kyseliny trihydrogenfosforečné. Tím se snižuje pH vystírky důležité pro správnou činnost enzymů.

2.fáze

48 až 52 °C - **peptonizační teplota**

Dochází ke štěpení bílkovin na aminokyseliny a zmazovatění škrobu. Bílkoviny sice dodávají pivu pěnivost, ale zároveň snižují jeho stabilitu a trvanlivost.

3.fáze

60 až 65 °C - **nižší cukrotvorná teplota**

Odebere se jedna třetina vystírky a zahřeje se na 70 až 75 °C ve rmutovacím kotli, zde dochází ke ztekucení škrobu. Následně se vrátí zpět do vystírací kádě, kde teplota vystírky stoupne na 60 až 65 °C. Probíhá zde štěpení polysacharidů glukoamylázami. Tento způsob se nazývá infuzní tedy jednormutový. V České republice se používá způsob vícermutový, kdy se vystírka před vrácením do vystírací kádě krátce povaří a tento postup se opakuje podle počtu rmutů. Nejčastěji se používá tří rmutový způsob, vystírka dosahuje ve třetím rmutu teploty až 80°C. Výsledný rmut obsahuje sladinku a mláto.

2.10.12 Scezování

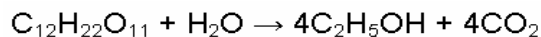
Cílem scezování je oddělení získaného extraktu (sladinky) od pevného podílu (mláta). Oddělení probíhá ve scezovacích kádích sedimentačně. Čirá sladinka se přečerpá do mladinového kotle.

2.10.13 Chmelovar

V mladinovém kotli se sladinka zahřeje k varu a přidá se chmel. Probíhá extrakce hořkých chmelových látek do roztoku sladinky, denaturace bílkovin, vznikají barevné sloučeniny. Dochází k deaktivaci sladových enzymů, sterilaci a mírnému poklesu pH. Odpařuje se nadbytečná voda a vzniká mladina. Ta se následně zchladí na zákvasnou teplotu 5 – 8 °C. Důležité je zamezit mikrobiální kontaminaci. Před přečerpáním mladiny na spilku se sytí kyslíkem, což je důležité pro správnou činnost kvasinek.

2.10.14 Kvašení mladiny

Probíhá na spilkách (otevřené kvasné kádě), cílem je přeměna zkvasitelných sacharidů (glukózy a maltózy) kvašením na ethanol a oxid uhličitý.



Lze použít dva typy pivovarských kvasinek:

A) Svrchní pivovarské kvasinky při teplotách až 24 °C

B) Spodní pivovarské kvasinky při teplotách 6 - 12 °C (obvyklejší)

fáze kvašení (5-7 dní)

- zakvašení (přidání kvasinek z propagační stanice)
- zaprašování (bílá pěna na povrchu)
- bílé kroužky (jemná smetanová pěna)
- hnědé kroužky (zhnědnutí pěny)
- deka (velmi hustá celistvá pěna)
- mladé pivo (po stáhnutí deky)

2.10.15 Dokvašování a zrání mladého piva

Cílem je dodat pivu oxid uhličitý nechat ho dozrát a vyčiřit. Probíhá v ležáckých tancích při teplotě 1 – 3 °C přibližně týden. Moderní náhradou spilek a ležáckých tanků jsou CKT (cylindro - kónické tanky), kde probíhá kvašení i dokvašování piva. [14]

2.11 Výskyt mykotoxinů

2.11.1 V ječmeni

V ječmeni se vyskytují především fusariotoxiny; Nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), T – 2 toxin, HT – 2 toxin a zearalenon. Důležitým faktorem vzniku mykotoxinů je počasí v daném roce. Napadení ječmene se projevuje hnědými skvrnami na obilkách, což je obtížně identifikovatelné. Pro správné načasování účinné ochrany je důležité sledování podmínek v období od konce května do konce června. Jedná se o délku slunečního svitu, srážky, maximální a minimální teploty, vzdušnou vlhkost. Zdroje infekce mohou zůstat na hostitelských rostlinách až tři roky. Ke kontaminaci ječmene může dojít během vegetace i při skladování. Aplikací fungicidů a preventivních opatření lze významně snížit produkci mykotoxinů.

2.11.2 Ve sladu

U některých mykotoxinů, jako například DON, může při máčení ječmene jejich obsah klesnout. Je to pravděpodobně způsobeno rozpustností či vyplavením nečistot a zbytků. Fusárie jsou však stále schopny produkce mykotoxinů i po ukončení stádií sladování. Při sledování infikovaného ječmene během sladování, se zjistilo, že se obsah mykotoxinů může zvýšit. Jako nejlepší z hlediska prevence se zatím jeví ošetření ječmene již ve stádiu vegetace. Ozařování a ošetřování ječmene ozónem před začátkem sladování je ve stádiu výzkumů. Tyto metody nezanechají žádné residua mykotoxinů.

2.11.3 V pivu

Mykotoxiny se mohou do piva dostat nejen ze sladu, ale i z chmele. Zvýšený obsah mykotoxinů v pivě může způsobovat přepěňování piva tzv. gushing. Nově byl v pivu, vedle DON a acetylovaných forem DON, prokázán také konjugát DON-3-Glc, který se v pivu nachází v koncentracích srovnatelných či dokonce převyšujících koncentrace DON. Kontrolami, pečlivým výběrem ječmene a chmele lze výrazně snížit obsah mykotoxinů v pivě.

2.11.4 Legislativa

Podle nařízení Komise Evropských společenství č. 1831/2003 jsou stanoveny maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Těmito stanovami se řídí i ČSPS a ve svém metodickém doporučení shrnuje maximální limity mykotoxinů, které mohou kontaminovat pivovarské suroviny. [15]

Tab. 8: Sladovnický ječmen, výrobky z ječmene

Mykotoxiny	Maximální limity $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Závazné požadavky	
Aflatoxin B ₁	2,0
$\sum B_1+B_2+G_1+G_2$	4,0
Ochratoxin A	3,0
Deoxynivalenol	1250,0
Zearalenon	100,0
Fumonisiny $\sum B_1+B_2$	1000,0
Doporučené požadavky	
Sterigmatocystin	20,0
Patulin	100,0

Tab. 9: Upravený chmel

Mykotoxiny	Maximální limity $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Doporučené požadavky	
Aflatoxin B ₁	20,0
$\sum B_1+B_2+G_1+G_2$	40,0
Sterigmatocystin	20,0
Patulin	100,0
Ochratoxin A	10,0

2.12 Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v ječmeni a sladu

Analytické stanovení mykotoxinů se skládá z několika na sebe navazujících kroků, z nichž každý rozhoduje o výsledku analýzy. [16]

2.12.1 Odběr a zpracování vzorku

Odběr a zpracování vzorku je prvním a velmi důležitým procesem. Vzorky potravinových surovin, potravin a krmiv jsou často nehomogenní. Odběry se musí provádět z šarží o značné hmotnosti či počtu jednotek. Odběr vzorku rozhodujícím způsobem ovlivňuje výsledky stanovení. Vzorky je nutné dezintegrovat ve vhodném zařízení (např. mlýnek).

2.12.2 Extrakce

Provádí se na laboratorní třepačce v uzavřené erlenmayerově baňce, na homogenizátoru nebo ultrazvukem. Vzhledem k charakteru a stálosti mykotoxinů se extrakce provádí za laboratorní teploty. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používá methanol, octan ethylnatý, chloroform, aceton a acetonitril, popřípadě jejich vodné roztoky. Po extrakci se vzorky odstředí popřípadě ještě přefiltrují.

2.12.3 Čištění

Dříve se provádělo extrakcí z kapaliny do kapaliny. Metoda je založena na různé rozpustnosti látek ve dvou nemísitelných rozpouštědlech.

Imunoafinitní chromatografie (IAC)

V současné době se používá čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitní kolonce, má vysokou specifitu a menší spotřebu organických rozpouštědel. Protilátky obsažené v kolonce se reverzně spojí s mykotoxinem v extraktu a tím ho zachytí. Mykotoxin je následně pomocí elučních směsí z kolonky eluován. Používá se pro stanovení např. aflatoxinů B, G, M₁, ochratoxinu A, deoxynivalenolu, fumonisinu B₁ a zearalenonu.

Extrakce na pevnou fázi (SPE)

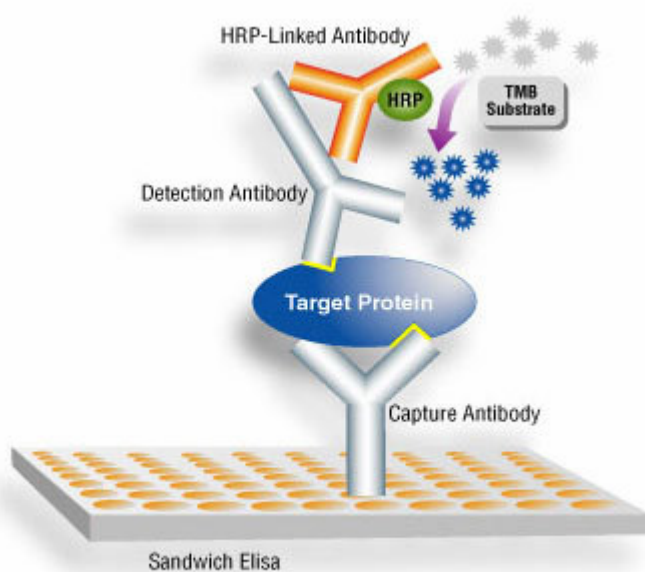
Jako další možnost se používá čištění na kolonkách SPE (solid phase extraction). Obsažené sorbenty jsou nepolární, středně polární a polární materiály na bázi modifikovaného silikagelu. Chromatografický sloupec kolonky je nejdříve promyt extraktem mykotoxinu, ten se zachytí na startu sloupce, a následně promývá eluční směsí, která mykotoxin uvolní.

2.12.4 Analytické metody

Mykotoxiny jsou nejčastěji stanoveny imunochemickými a chromatografickými metodami.

Imunochemické metody (ELISA)

Imunoenzymatická reakce je založena na reakci antigenu (mykotoxinu) s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem označeného antigenu či protilátky. Měření se provádí spektrofotometricky (závislost absorbance na koncentraci). [16]



Obr. 18: ELISA [17]

Chromatografické metody

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických metod. Je to separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, stacionární a mobilní. Dochází k transportu molekul složek mobilní fází, ty mohou být zachyceny stacionární fází, a proto se při transportu zdržují. Jednotlivé složky se rozdělí podle interakcí s jednotlivými fázemi.

Chromatografické techniky se dělí podle toho, v jakém skupenství se nachází mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze a podle separačního mechanismu:

Skupenství

- Kapalinová chromatografie (LC)
- Plynová chromatografie (GC)

Uspořádání stacionární fáze

- Plošné: papírová (PC), tenkovrstvá (TLC) a vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC)
- Kolonové: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separační mechanismus

- Rozdělovací
- Adsorpční
- Iontově – výměnný
- Gelový
- Afinitní

TLC

Ke stanovení mykotoxinů se používá výjimečně, slouží spíše jako orientační metoda pro kvalitativní stanovení. Dnes se často používá její modifikovaná verze, dvourozměrná TLC. Kapalným vzorkem se nanáší na začátek destičky. K separaci dochází unášením spolu s rozpouštědlem v tenké vrstvě sorbentu. Detekce se provádí vizuálně, pokud složky nejsou tvořeny barevnými látkami provede se zviditelnění aerosolem. Činidlo reaguje se složkami za vzniku barevných sloučenin. [16]

GC, GC/MS

Plynová chromatografie se používá k separaci těkavých, termicky stabilních látek s relativní molekulovou hmotností menší než 1000. Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Zde se složky separují na základě různých afinit ke stacionární fázi.

Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Z časového průběhu intenzity signálu se určí kvantitativní zastoupení složek.

Mezi komerčně využívané detektory patří plamenově ionizační detektor (FID), vodivostní detektor (TCD) a detektor elektronového záchytu (ECD). Spojení s hmotnostním detektorem GC/MS má velký význam při určování neznámých složek směsí. Ionty jsou analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí. Pro každou složku získáme hmotnostní spektrum, které se identifikuje porovnáním s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači.

HPLC, LC/MS

Kapalinová chromatografie se používá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo tepelně nestálé. O separaci složek vzorku rozhodují interakce se stacionární i mobilní fází. Během separace se analyt rozděluje mezi stacionární a mobilní fází. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. U kapalinové chromatografie postupuje mobilní fáze působením gravitační síly, zatímco u vysokoúčinné kapalinové chromatografie je třeba použít čerpadlo k docílení vysokého tlaku v systému.

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyt a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Fotometrické detektory patří k nejběžněji používaným. měří absorpenci eluátu vycházející z kolony. Pro optimální citlivost musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kyvety, již prochází paprsek. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, složitější umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek. Citlivost je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu látky. Fluorescenční detektory jsou založeny na principu fluorescence tedy schopnosti látky absorbovat ultrafialové záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce. Toto záření se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Lze jej vhodně kombinovat s fotometrickým detektorem.

HPLC ve spojení s hmotnostního detektorem HPLC/MS přináší velké výhody při určování neznámých složek směsí. Hmotnostní spektrometrie je separační a zároveň analytická metoda. Její podstatou je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul v magnetickém poli. Ionty jsou analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí. Změnami intenzit elektrického a magnetického pole lze dosáhnout rozvinutí hmotnostního spektra. [18]

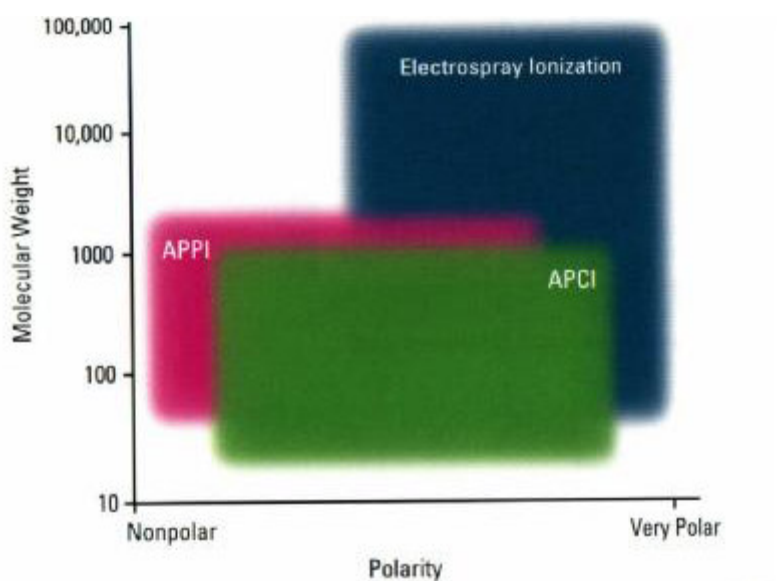
2.13 Hmotnostní spektrometr finnigan LCQ Advantage MAX

Iontový zdroj Ion Max API umožňuje výměnu sondy (Probe), a může tak pracovat v módu APCI nebo ESI. Může generovat kladné nebo záporné ionty.

ESI je tzv. měkká ionizační technika a je velice užitečná při analýze polárních molekul s relativní molekulovou hmotností menší než 100 000.

APCI je také měkká ionizační technika. Je použitelná k analýze méně polárních látek s relativní molekulovou hmotností do 1 500. Při průchodu tryskou (APCI Nozzle) se roztok vzorku za pomoci proudu dusíku rozprašuje do vaporizéru, kde se odpařuje rozpouštědlo. Na jehlu (Corona discharge needle) je vložen vysoký potenciál. Vytváří se koronový výboj, který prostřednictvím série chemických reakcí s rozpouštědlem a dusíkem formuje ionty analytu.

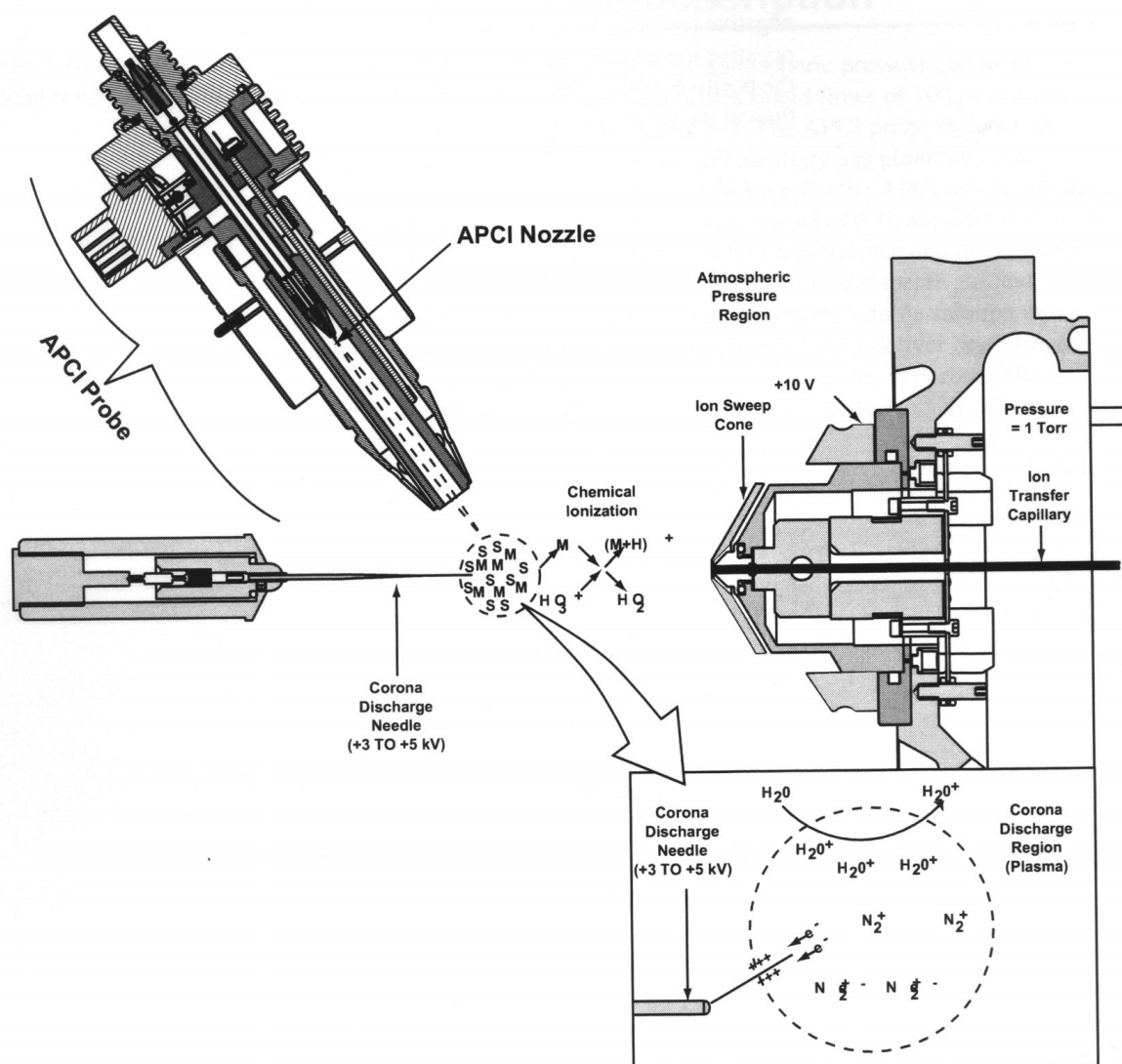
Ionty jsou nasávány do vyhřívané kapiláry (Ion transfer capillary), která je transportuje do iontové optiky.



Obr. 19: Graf - použití ionizačních technik v závislosti na molekulové váze [19]



Obr. 20: Vysokoučinný kapalinový chromatograf Finnigan Surveyor s MS detektorem Finnigan LCQ Advangate a příslušenstvím



Obr. 21: Mechanismus chemické ionizace za atmosferického tlaku (APCI) v pozitivním módu [20]

Iontová optika se skládá ze dvou oktapólů, které usměrňují a zaostřují tok iontů přicházejících z iontového zdroje. Působí také jako přechod z oblasti s atmosferickým tlakem do oblasti vysokého vakua.

Hmotnostním analyzátozem je zde iontová past a **detektorem** Elektronásobič.

Takovéto uspořádání umožňuje dva **módy měření**:

MS scan zahrnuje měření pouze tzv. rodičovských iontů, tedy bez použití fragmentace.

MSⁿ scan probíhá ve dvou nebo více fázích, při kterých jsou rodičovské ionty fragmentovány.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Stanovení deoxynivalenolu (DON) metodou HPLC/MS/MS

Bakalářská práce se zabývá optimalizací přípravy vzorků ječmene a sladu ke stanovení deoxynivalenolu. Byl sledován vliv délky ultrazvuku na množství vyextrahovaného deoxynivalenolu ze vzorku ječmene a sladu. Deoxynivalenol byl dále stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

Pro experiment byl použit vzorek odrůdy ječmene Jersey a z něj vyrobeného sladu, s předplodinou kukuřice, v experimentální variantě: umělá infekce plísní *Fusarium*, ošetření fungicidem a adjuvantem

3.1.1 Princip metody

DON je ze vzorků extrahován vodou. Extrakt je přečištěn přes imunoafinitní kolonku DONPREP. Kvantifikace obsahu DON je prováděna pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní (MS) detekcí.

3.1.2 Přístroje a zařízení

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Finnigan Surveyor s MS detektorem Finnigan LCQ Advangate a příslušenstvím

Analytické váhy

Předvážky

Chladnička s mrazničkou

Laboratorní mlýnek

Ultrazvuková lázeň

Laboratorní odstředivka

Zařízení pro výrobu deionizované vody

Imunoafinitní kolonky (DONPREP)

Skleněné filtry (např. Whatman)

Hamiltonovy stříkačky (100, 50, 25 μ l)

Kalibrované odměrné sklo

3.1.3 Chemikálie, roztoky, materiály

Deoxynivalenol, standard o $c = 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Methanol, čistota pro HPLC nebo vyšší

Deionizovaná voda

Octan amonný

3.1.4 Příprava roztoků

0,01 molární octan amonný

Do 800ml kádinky se naváží $380 \pm 10\text{mg}$ octanu amonného. Přidá se 500ml deionizované vody a kádinka se vloží na cca 5 minut do ultrazvukové lázně.

Zásobní roztok DON o koncentraci $1\mu\text{g/ml}$

$10\mu\text{l}$ standardu DON o $c = 100\mu\text{g.ml}^{-1}$ se nadávkuje pomocí $25\mu\text{l}$ Hamiltonovy stříkačky do 1 ml směsi MeOH : H₂O 50 : 50 (v : v). Tento zásobní roztok je stabilní při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 měsíce ve tmě.

Kalibrační roztoky

Kalibrační roztoky se získají nadávkováním 10, 20, 50, 100 a $200\mu\text{l}$ zásobního roztoku DON o $c = 1\mu\text{g.ml}^{-1}$ (pomocí Hamiltonovy stříkačky o objemu 25, 50 nebo $100\mu\text{l}$) do směsi MeOH : H₂O, 50 : 50 (v : v). Tímto vzniknou kalibrační roztoky o koncentraci 10 – 200ng.ml^{-1} .

3.1.5 Pracovní postup

Extrakce

Do lyofilizační lahve se naváží 25 gramů (s přesností 0,01g) homogenizovaného vzorku a přelije se 200ml deionizované vody. Vzorek se dále extrahuje na ultrazvuku po dobu 10, 20 a 30 min. Homogenizovaný vzorek se centrifuguje při $6000\text{ ot.}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 10 minut. V případě zákalu se supernatant zfiltruje přes skleněný filtr do předložené nádoby.

Přečištění a příprava vzorku pro HPLC – MS/MS analýzu

2 ml zfiltrovaného extraktu se aplikují na imunoafinitní kolonku (DONPREP) průtokem 1-2 kapky za sekundu. K promytí se použije 5 ml deionizované vody. Eluce je prováděna opakovaně (3x) 1,5 ml methanolu průtokem 1 kapky za sekundu nebo pomaleji. Před HPLC – MS/MS analýzou je možné vzorek zfiltrovat přes nylonový mikrofiltr.

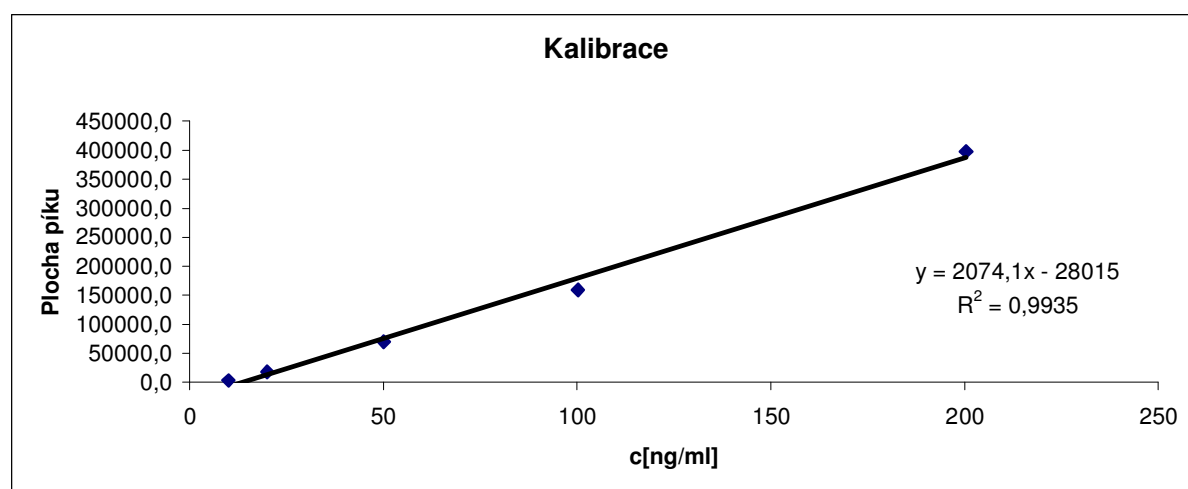
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Kalibrace

Kalibrační roztoky o koncentracích 10, 20, 50, 100 a 200 ng.mL⁻¹ byly analyzovány metodou HPLC-MS/MS. Byla sestrojena kalibrační křivka (*Obr. 22*) závislosti koncentrace standardu deoxynivalenolu na ploše píku (Tab. 10). Kalibrační křivka je v daném rozsahu lineární.

Tab. 10: Kalibrace

Kalibrace	
c[ng.mL ⁻¹]	plocha píku
10,02	3275,0
20,04	18265,5
50,1	70391,5
100,2	159615,0
200,4	398109,5



Obr. 22: Graf - Kalibrace

4.2 Podmínky analýzy:

HPLC

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf: Finnigan Surveyor

Kolona: Luna 5 μ Phenyl – Hexyl 100A 150x4,6mm

Mobilní fáze: methanol/10mM octan amonný, 20/80 (v/v), gradientová eluce

Průtok: 0,5 mL.min⁻¹

Teplota kolony: 40°C

Objem nástřiku: 25 μ l

MS

Hmotnostní detektor: Finnigan LCQ Advangate

Iontový zdroj: APCI, negativní mód

Skenovací mód: MS/MS

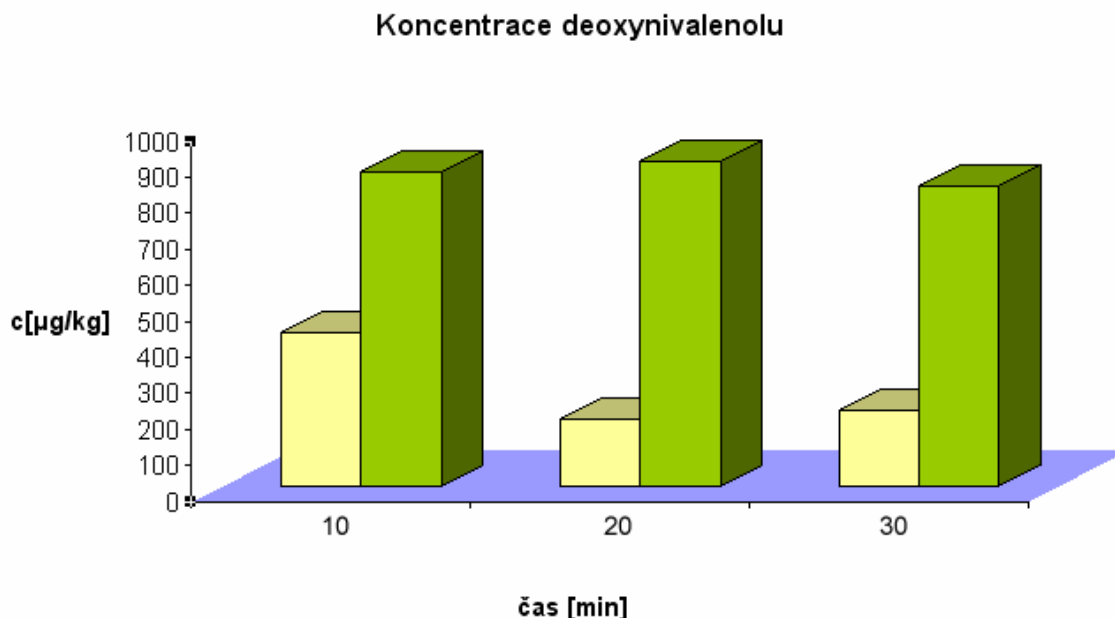
Monitorované ionty m/z: DON 355 > 295 (265)

4.3 Stanovení deoxynivalenolu ve vzorku ječmene a sladu metodou LC-MS/MS

Pro stanovení optimální délky použití ultrazvuku pro extrakci deoxynivalenolu byly provedeny tři varianty délky ultrazvukování (10, 20 a 30 minut). Naměřené výsledky jsou znázorněny v Tab.11. Ke stanovení deoxynivalenolu byla použita metoda HPLC–MS/MS .

Tab. 11: Koncentrace deoxynivalenolu ve vzorcích ječmene a sladu

čas[min]	označení vz.	plocha píku	z kalibrace	c[μ g.kg ⁻¹]
10	ječmen_I	121817,0	71,04	426,3
20	ječmen_II	39631,5	30,72	184,3
30	ječmen_III	48258,5	34,95	209,7
10	slad_I	273577,0	145,51	873,1
20	slad_II	283064,5	150,16	901,0
30	slad_III	259661,5	138,68	832,1



Obr. 23: Graf – Závislost koncentrace deoxynivalenolu na době extrakce ultrazvukem

Z výsledků (*Obr. 23*) vyplývá, že prodloužení délky použití ultrazvuku nemá vliv na vyextrahování deoxynivalenolu ze vzorku sladu. Analytické metoda, používaná na VÚPS (10 minut extrakce ultrazvukem) je dostatečná. Po 10 minutách použití ultrazvuku zůstává obsah deoxynivalenolu ve vzorku sladu neměnný. Výsledky v rozmezí 832-901 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ lze pokládat za shodné.

U vzorku ječmene obsah deoxynivalenolu kolísal v rozmezí 184–426 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. U vzorku „Ječmen_I“ byla koncentrace deoxynivalenolu dvojnásobná oproti vzorkům „Ječmen_II“ a „ječmen_III“. U vzorku „Ječmen-II“ a „Ječmen_III“ se již obsah deoxynivalenolu výrazně neměnil. Lze předpokládat, že na vyšší obsah deoxynivalenolu ve vzorku ječmene „Ječmen_I“ měla vliv délka extrakce. Při delší době použití ultrazvuku by mohlo docházet k rozpadu analytu. Z důvodu ložiskového výskytu mykotoxinu ve vzorcích je ale i možné, že vzorek nebyl dostatečně homogenizovaný. Proto by bylo dobré v experimentu dále pokračovat s větším počtem vzorků.

Naměřený obsah deoxynivalenolu ve vzorku sladu byl několikanásobně vyšší než obsah deoxynivalenolu ve vzorku ječmene. I přesto obsah žádného vzorku nebyl nad hygienickým limitem, který je pro ječmen a slad 1250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá mykotoxiny, jejich výskytem v obilovinách a možnostmi jejich stanovení. Největší pozornost byla věnována Deoxynivalenolu, který se vyskytuje v pivovarských surovinách.

Byla vypracována literární rešerše zabývající se nejvýznamnějšími mykotoxiny a jejich producenty. Dělení mykotoxinů není jednoznačné, proto zde bylo uvedeno několik možných variant. Tato část se zaměřila jak na vlastnosti mykotoxinů a možné příčiny jejich vzniku tak i na jejich dopad v zemědělství a potravinářském průmyslu. Je zde nastíněna toxicita a struktura jednotlivých mykotoxinů a možná obrana před jejich tvorbou. Dále tato část práce shrnuje výskyt mykotoxinů v pivovarských surovinách a jejich následky při kontaminaci. Jsou zde uvedeny suroviny užívané v pivovarnictví a jejich možná kontaminace, dále výroba sladu a piva, při které může opět dojít ke kontaminaci nebo zvýšení obsahu mykotoxinů. Směrnice evropské unie limitující obsahy jednotlivých mykotoxinů v pivovarských surovinách přesně stanovují množství mykotoxinů, které tyto suroviny mohou obsahovat. Existuje více možností jejich stanovení, je proto nutné rozdělit tyto možnosti podle přesnosti, rychlosti a finanční náročnosti. Od jednoduchých a dostupných testů ELISA až po nejnáročnější stanovení pomocí HPLC.

V experimentální části byla provedena optimalizace přípravy vzorku ječmene a sladu ke stanovení mykotoxinu deoxynivalenol. Byl sledován vliv délky ultrazvuku na množství vyextrahovaného deoxynivalenolu ze vzorku ječmene a sladu. Bylo zde objasněno, že analytická metoda používaná na VÚPS je dostatečná a není tedy nutno provádět extrakci na ultrazvuku déle než deset minut. K prokázání tohoto tvrzení byl obsah deoxynivalenol stanoven na přístroji HPLC – MS/MS Finnigan Surveyor s detektorem Finnigan LCQ Advangate.

Až 25% celosvětové sklizně je kontaminováno mykotoxiny. Je nutné konstatovat, že mykotoxiny jsou velmi nebezpečné látky, které jsou bohužel rozšířené v potravinářském i hospodářském průmyslu. Je třeba se jim bránit a vyhýbat ať už dostatečným ošetřením plodin při jejich pěstování či následným dodržením striktních podmínek při skladování. Pokud ani tyto kroky nedostačují je nutné velmi podrobné monitorování ječmene a sladů metodami HPLC před jejich následným užitím v potravinářském průmyslu..

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf,
staženo dne 12.01.2009

<http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtobec.htm>,
staženo dne 12.01.2009

<http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2003/vvf-13-03.pdf>,
staženo dne 12.01.2009

<http://www.wikipedia.org>, staženo dne 16.10.2008

<http://www.chpr.szu.cz>, staženo dne 13.3.2009

<http://upload.wikimedia.org>, staženo dne 3.2.2009

<http://www.fermentek.co.il>, staženo dne 3.2.2009

<http://www.aspergillusflavus.org/images/AFB1.gif>, staženo dne 5.2.2009

<http://www.axxora.com/files/formula/630-103.gif>, staženo dne 18.3.2009

<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/aflatox2.html>, staženo dne 3.2.2009

<http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/fachinformationen/verbraucherschutz/unerwuenschtestoffe/pic/aflafo4.gif>, staženo dne 11.4.2009

http://www.aflatoxin.info/images/afla_2.jpg, staženo dne 3.4.2009

KOSAŘ, K., Procházka, S. a kolektiv autorů: *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd.

Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sadařský, a. s., 2000. 31,76 s.
ISBN 80-902658-6-3.

BABÁK L.; *Technologie výroby piva. Přednášky BIOTECHNOLOGIE I*, VUT Brno 2009

Ing. Zuzana Radová-Sypecká ve spolupráci s Prof. Ing. Janou Hajšlovou, CSc.: *Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření*. VVF-04-02

MALÍŘ F., OSTRÝ V. a kol. autorů: *Vláknité mikromycety (Plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*, Brno 2003.

http://newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=70&Itemid=20

KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplněné vydání Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003
ISBN 80-86369-07-2

http://holcapek.upce.cz/publications_CZ.htm, staženo dne 18.10.2008

Finnigan Ion Max API Source hardware manual, Thermo Electron corp., San Jose, California, 2003

ZÖLLER P., MAYER-HELM B.: *Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1136 (2006) 123-169

WOLF-HALL CH. E.: *Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing*, International Journal of Food Microbiology 119 (2007) 89-94

SCHWARZ P.B., CASPER H. H., BEATTIE S.: *Fate and Development of Naturally Occurring Fusarium Mycotoxin During Malting and Brewing*

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

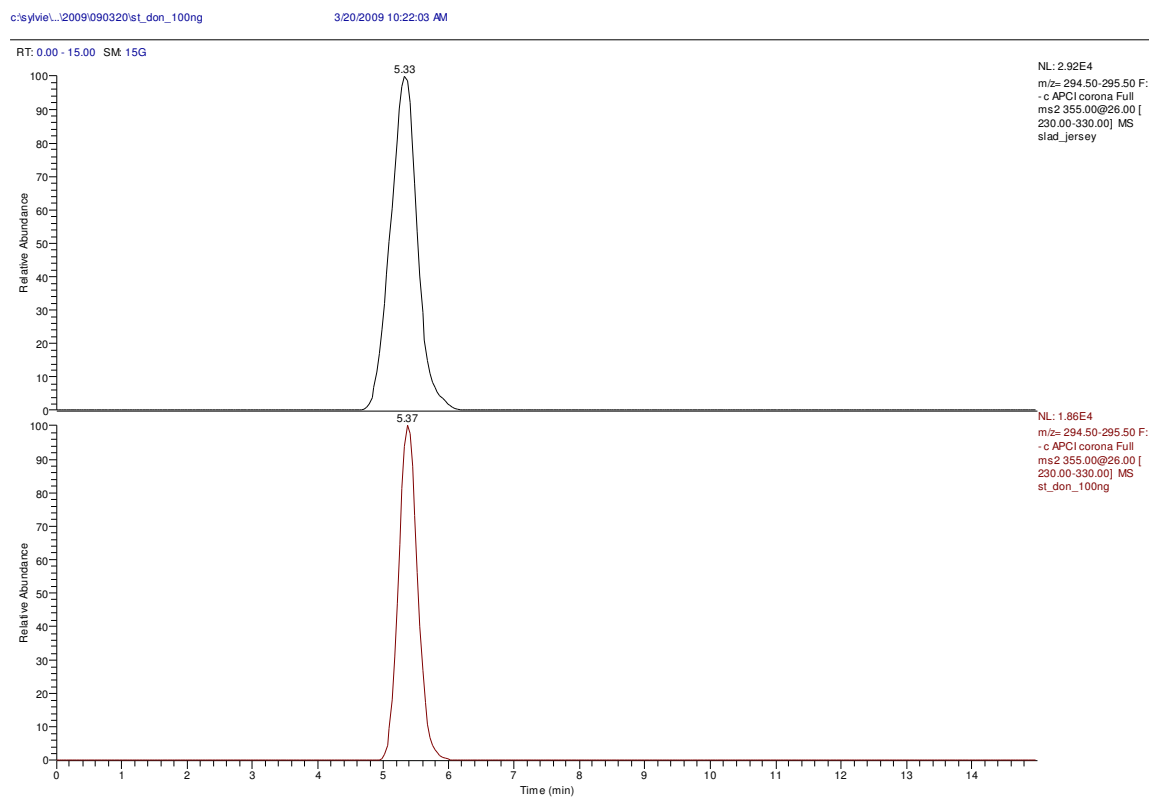
Tab.	tabulka
kys.	kyselina
HPLC	high-pressure liquid chromatography
<i>Obr.</i>	obrázek
ZON	Zearalenon
OTA	Ochratoxin
FDA	Food and drug administration
NIV	Nivalenol
DAS	Diacetoxyscirpenol
CKT	cylindrokónické tanky
TLC	thin layer chromatography
MS	mass detector
UV	ultraviolet
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
API	atmosférický ionisátor
ESI	electrospray ionisation
GC	Gas chromatography
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization

8 SEZNAM PŘÍLOH

Obr. 24: Chromatogram: vzorku sladu uměle infikovaného plísní Fusarium, ošetřeného fungicidem a adjuvantem a standardu deoxynivalenolu

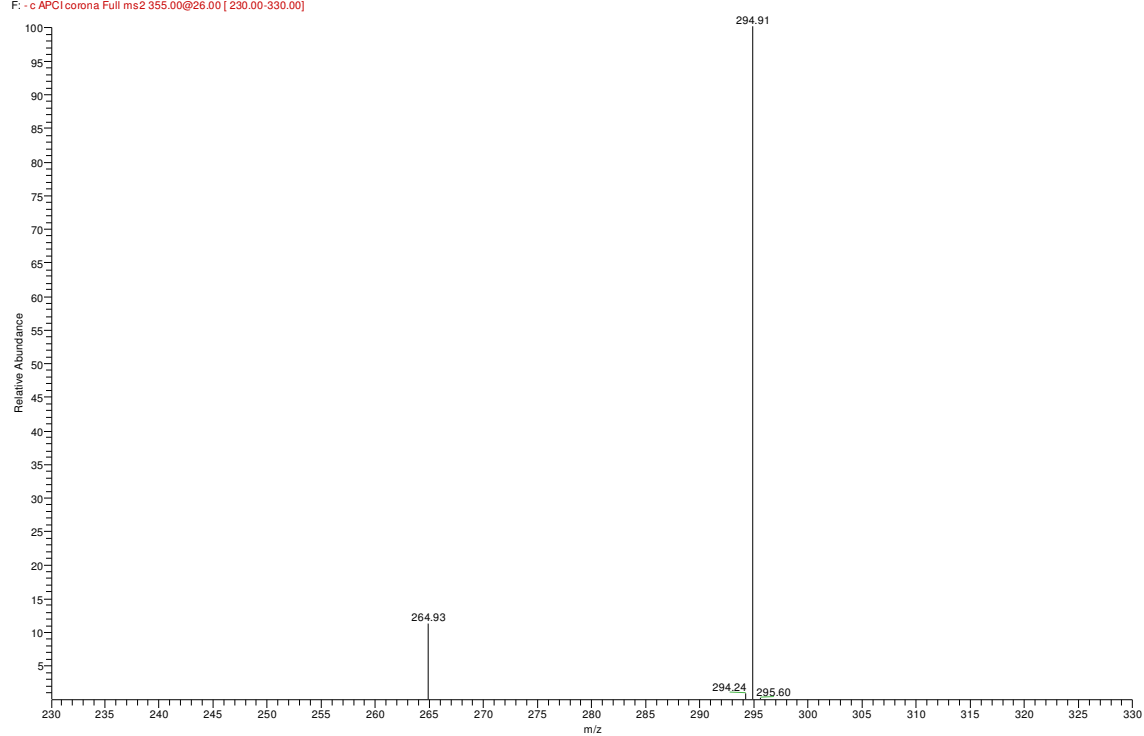
Obr. 25: MS/MS spektrum standardu deoxynivalenolu

9 PŘÍLOHY



Obr. 24: Chromatogram: vzorku sladu uměle infikovaného plísní *Fusarium*, ošetřeného fungicidem a adjuvantem a standardu deoxynivalenolu

st_don_100ng #270-292 RT: 5.21-5.60 AV: 11 NL: 1.43E4
F: -c APCI corona Full ms2 355.00@26.00 [230.00-330.00]



Obr. 25: MS/MS spektrum standardu deoxynivalenolu